

论著·基础研究

轻链单个氨基酸改变可增强新冠病毒嵌合抗体的中和能力

殷 姿, 廉朝阳, 高 波, 田 莹, 郝 茜[#], 叶菱秀[#]

上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海市免疫学研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·筛选对新冠病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)具有中和能力的人鼠嵌合抗体,并分析其轻链上的关键氨基酸位点变化。**方法**·以 SARS-CoV-2 刺突蛋白作为免疫原,免疫抗体重链基因人源化的小鼠,通过酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和假病毒中和实验检测小鼠血清抗体水平,应用流式细胞术分选小鼠脾脏和淋巴结中的浆细胞和生发中心(germinal center, GC)B细胞并分析各类B细胞比例。提取细胞的RNA构建鼠源抗体轻链基因文库,与固定的人源抗体重链基因配对表达抗体,并采用ELISA筛选高亲和力嵌合抗体。与鼠源胚系抗体轻链基因比对,分析高亲和力嵌合抗体轻链的氨基酸变化位点。分别构建并表达轻链单个氨基酸位点改变的嵌合抗体,通过ELISA和假病毒中和实验检测其亲和力及中和能力;比较上述位点改变前后嵌合抗体的亲和力及中和能力,并分析具有关键作用的氨基酸位点变化。**结果**·与未免疫小鼠相比,免疫后小鼠血清中针对SARS-CoV-2的特异性抗体的滴度增加,脾脏和淋巴结中的浆细胞和GC B细胞的比例亦有增加。ELISA的结果显示,从小鼠脾脏的GC B细胞中筛选到具有高亲和力的嵌合抗体。该抗体轻链的第76位苏氨酸替换成了异亮氨酸,且第98位苯丙氨酸发生缺失。随后,ELISA结果显示,该嵌合抗体具有较强的亲和力,轻链氨基酸没有变化的抗体和轻链仅携带第98位氨基酸缺失的抗体的亲和力较弱,而轻链仅携带第76位氨基酸替换的抗体的亲和力介于嵌合抗体和轻链氨基酸没有变化的抗体之间。假病毒中和实验的结果显示,该嵌合抗体的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为0.995 ng/μL;轻链仅携带第76位氨基酸替换的抗体的IC₅₀为1.724 ng/μL,中和能力有所减弱;轻链仅携带第98位氨基酸缺失的抗体的IC₅₀为71.05 ng/μL,轻链氨基酸没有变化的抗体的IC₅₀为42.06 ng/μL,中和能力均较弱。**结论**·成功筛选得到对SARS-CoV-2具有中和能力的人鼠嵌合抗体,且该抗体轻链上第76位苏氨酸替换为异亮氨酸是决定其中和能力的关键。

[关键词] 嵌合抗体;中和抗体;新冠病毒;轻链;体细胞高频突变**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.06.008 **[中图分类号]** R392.11 **[文献标志码]** A

Enhancement of the neutralization ability resulting from a single amino acid change in the light chain of a chimeric antibody against SARS-CoV-2

YIN Zi, LIAN Chaoyang, GAO Bo, TIAN Ying, HAO Qian[#], YEAP Lengsiew[#]

Shanghai Institute of Immunology, Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To screen the human-mouse chimeric antibodies that neutralize the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and analyse the key amino acid site changes in their light chain. **Methods**·Antibody heavy chain gene-humanized mice were immunized with the spike protein of SARS-CoV-2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and pseudovirus neutralization assay were performed to analyse the antibody titer in serum level. Flow cytometry was used to sort plasma cells and germinal center (GC) B cells from the mouse spleen and lymph nodes, and the proportions of different B cells were analysed. RNA was extracted to construct a mouse-origin antibody light chain gene library, which was paired with the knocked-in human-origin antibody heavy chain gene for antibody expression. ELISA was employed to screen for high-affinity chimeric antibodies. Amino acid changes in the light chain of high-affinity chimeric antibodies were analysed by comparing them with mouse-origin germline antibody light chain genes. Chimeric antibodies with single amino acid changes in the light chain were constructed and expressed, and their affinity and neutralization abilities were tested through ELISA and pseudovirus neutralization experiments. By comparing the affinity and neutralization abilities of the chimeric antibodies with or without single amino acid changes in the

[基金项目] 国家自然科学基金(32000656);博士后创新人才支持计划(2020T130078ZX)。**[作者简介]** 殷 姿(1998—),女,硕士生;电子信箱: yinzi981030@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 郝 茜,电子信箱: haoqian_2019@shsmu.edu.cn。叶菱秀,电子信箱: yeaplengsiew@shsmu.edu.cn。[#]为共同通信作者。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China(32000656); China Postdoctoral Innovative Talent Support Program(2020T130078ZX)。**[Corresponding Author]** HAO Qian, E-mail: haoqian_2019@shsmu.edu.cn. YEAP Lengsiew, E-mail: yeaplengsiew@shsmu.edu.cn. [#]Co-corresponding authors.

light chain, the key single amino acid change was analysed. **Results** Compared to unimmunized mice, the immunized mice showed an increased titer of specific antibodies against SARS-CoV-2 on the serum level, along with an elevated proportion of plasma cells and GC B cells in the spleen and lymph nodes. ELISA showed that a high-affinity chimeric antibody was screened from GC B cells in the mouse spleen. The light chain of the antibody had a 76th serine-to-isoleucine substitution and a 98th phenylalanine deletion. Another ELISA showed that the chimeric antibody exhibited high affinity, the antibody without amino acid change on the light chain and the antibody with only the 98th phenylalanine deletion showed low affinity, and the antibody with only the 76th serine-to-isoleucine substitution demonstrated intermediate affinity between the chimeric antibody and the antibody without amino acid change on the light chain. Pseudovirus neutralization experiments revealed that the chimeric antibody had a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.995 ng/ μ L; the antibody with only the 76th serine-to-isoleucine substitution had an IC_{50} of 1.724 ng/ μ L, indicating a slight decrease in neutralization ability; the antibody with only the 98th phenylalanine deletion had an IC_{50} of 71.05 ng/ μ L; the antibody without amino acid change on the light chain had an IC_{50} of 42.06 ng/ μ L, suggesting weak neutralization ability. **Conclusion** For the screened human-mouse chimeric antibodies that neutralize SARS-CoV-2 in this study, the key amino acid change determining the neutralization ability of the chimeric antibody is the 76th serine-to-isoleucine substitution.

[Key words] chimeric antibody; neutralizing antibody; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); light chain; somatic hypermutation

抗体是分泌形式的B细胞受体 (B cell receptor, BCR), 由2条相同的重链和2条相同的轻链组成^[1]。编码抗体重链的基因由可变 (variable, V)、多样 (diversity, D) 和连接 (joining, J) 基因组成, 编码轻链的基因仅由V和J基因组成。抗体重链和轻链的氨基端可结合抗原且序列高度可变, 被称为抗体V区。在该区中存在一些氨基酸序列高频变化的区域, 称为互补决定区 (complementarity-determining region, CDR), 且重链和轻链的CDR在立体构象上共同决定了抗体分子的独特性^[2]。在抗体重链或轻链的V区, CDR以外的氨基酸组成了骨架区 (framework region, FR)。在抗体多样化的过程中, B细胞首先会发生VDJ基因随机重排以形成多样的抗体库, 而后于外周生发中心 (germinal center, GC) 经历抗原刺激发生体细胞高频突变 (somatic hypermutation, SHM), 从而使抗体V区发生氨基酸改变及类别转换重排, 以进一步增加抗体的多样性。

中和抗体 (neutralizing antibodies, nAbs) 可以直接结合病毒表面的抗原, 保护宿主细胞。广谱中和抗体 (broadly neutralizing antibodies, bnAbs) 是指能够对同一种病毒的各类突变株具有中和作用的特殊抗体。目前, 已有研究筛选到针对流感病毒^[3-4]及人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)^[5-6]的bnAbs。

抗体基因序列发生突变的数量和位置可影响其自身的功能。研究发现, HIV的bnAbs的SHM极高, 如在VRC01抗体谱系中存在高达40%~48%的氨基酸改变^[7]; 而在SARS-CoV-2的nAbs中通常只在CDR有1~2个突变发生^[8]。在人鼠嵌合抗体中重链FR的

单个氨基酸改变可使其活性发生极大改变^[9], 一些nAbs可通过重链CDR3结合SARS-CoV-2的受体结合结构域 (receptor-binding domain, RBD) 来发挥作用^[10-12], 因此许多研究者认为抗体重链氨基酸变化是决定其亲和力的关键。抗体行使功能时需要重链和轻链配对形成完整结构, 而过往研究鲜少关注到抗体轻链氨基酸变化对亲和力的影响。因此, 本研究聚焦于人鼠嵌合抗体轻链, 探讨在具有中和SARS-CoV-2能力的人鼠嵌合抗体中, 其轻链的氨基酸改变是否对抗体亲和力有关键影响, 期望能够为nAbs和bnAbs的筛选提供新的思路并为人源化抗体编辑工程提供一定的基础。

1 对象与方法

1.1 实验对象

1.1.1 实验动物 以C57BL/6品系雌性小鼠为背景小鼠, 用已重排的人源IGHV1-2*02、IGHD2-15*01、IGHJ1*01基因替换小鼠染色体上的J基因, 并委托赛业生物科技有限公司构建抗体重链基因人源化小鼠, 动物生产许可证号为SCXK (苏) 2022-0016。

将上述已构建小鼠 (实验组、对照组各3只) 饲养于上海交通大学医学院实验动物中心清洁级动物房的标准笼中, 3只/笼, 使用许可证号: SYXK (沪) 2018-0027。饲以标准饲料, 自由摄食、饮水。饲养条件: 照明周期为12 h/12 h, 温度约为25 °C, 湿度为50%~60%, 环境噪声小于60 dB。

1.1.2 细胞与载体 293T细胞株由上海交通大学医学院梁启明课题组馈赠, 293S细胞株由上海交通大

医学院周爱武课题组馈赠, BHK21-ACE2 细胞由上海交通大学医学院徐颖洁课题组馈赠。抗体人源重链、人源轻链表达载体由上海交通大学医学院李福彬课题组馈赠。

1.1.3 主要试剂 MnJ 佐剂(由北京大学生命科学学院细胞分化与增殖教育部重点实验室蒋争凡课题组馈赠), 编码 SARS-CoV-2 RBD 的 mRNA 疫苗(由上海交通大学医学院徐颖洁课题组馈赠)。DMEM 培养基(Corning, 美国), 转染试剂(Polysciences, 美国), 无内毒素质粒大抽试剂盒(MACHEREY-NAGEL, 德国), 同源重组试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 无血清培养基(上海源培生物科技股份有限公司), SARS-CoV-2 刺突三聚体(spike trimer, S-trimer)蛋白(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司), N96 DNA 产物纯化试剂盒、N96 高纯质粒 DNA 小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体重链基因人源化小鼠的免疫及其血清抗体水平分析 使用不同的 SARS-CoV-2 相关抗原成分对实验组小鼠进行多次免疫刺激, 即每次将抗原成分与 MnJ 佐剂混合后, 行腹腔和肌内同时注射; 其中, 第 0、2、5、8 周免疫刺激使用 RBD mRNA 作为抗原, 第 17、20 周使用包膜蛋白(spike membrane envelope, SME)作为抗原, 第 42 周使用 S-trimer 蛋白作为抗原。

于第 2、4、7 周, 收集 2 组小鼠血清并采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分析血清抗体水平; 于第 19、21 周, 再次收集小鼠血清并通过假病毒中和实验检测血清 nAbs 水平; 于第 43 周, 继续收集小鼠血清并通过 ELISA 分析其血清抗体水平(图 1)。而后, 选择血清中抗体水平最高的小鼠, 用于后续抗体筛选。

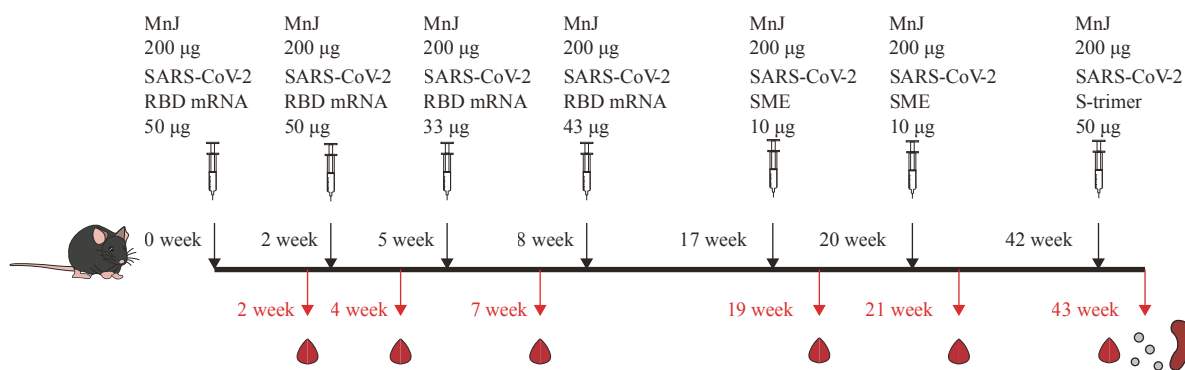


图 1 小鼠免疫及血清抗体水平分析

Fig 1 Mice immunization and analysis of serum antibody levels

1.2.2 小鼠脾脏和淋巴结 B 细胞的分选及分析 获取血清抗体水平最高的小鼠的脾脏以及位于腠窝、腹股沟和肾脏的淋巴结, 制备单细胞悬液。通过流式细胞术分选小鼠脾脏、淋巴结的浆细胞和 GC B 细胞作为抗体筛选候选细胞群, 并分析脾脏、淋巴结的幼稚 B 细胞占比。使用跨膜激活剂及钙调亲环素配体相互作用因子 [transmembrane activator and CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand) interactor, TACI] 和分化簇 138 (cluster of differentiation 138, CD138) 作为浆细胞表面的标记分子, 使用 B220 (B 细胞表面相对分子质量为 220 000 的分子) 作为 B 细胞表面的标记分子; 其中, B 细胞表面表达花生凝集素(peanut agglutinin, PNA) 的为 GC B 细胞, 不表达 PNA 的为幼稚 B 细胞。

1.2.3 鼠源抗体轻链基因文库的构建 分别裂解来

自脾脏、淋巴结的浆细胞和 GC B 细胞(由“1.2.2”中获取), 以构建 4 个不同的抗体轻链基因文库。行 RNA 抽提后经反转录获得 cDNA, 参考 VON BOEHMER 等^[13]设计的鼠源轻链混合简并引物序列, 并在其基础上添加载体同源臂序列以合成新的混合引物序列(具体序列信息见表 1、2), 通过两轮巢式 PCR 扩增轻链抗体 V 区基因序列, 以构建来自不同 B 细胞群的鼠源抗体轻链基因文库。第一轮巢式 PCR 的反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min (2 个循环); 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min (6 个循环); 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min (9 个循环); 72 °C 10 min。第二轮巢式 PCR 的反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min (12 个循环); 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min (23 个循环); 72 °C 10 min。

表 1 鼠源抗体轻链基因文库构建的第一轮巢式 PCR 的引物序列

Tab 1 Primer sequences of the first-round nested PCR for constructing mouse-origin antibody light chain gene library

Primer	Sequence (5'→3')
1mFK_I	RGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCT
1mFK_II	TGGACATGAGGGCYCCTGCTCAGT
1mFK_III	CTSTGGTTGTCTGGTGTGAYGGA
1mFK_IV	GTTGCTGCTGCTGTGGCTTACA
1mFK_V	GTATCTGGTACCTGTGG
1mFK_VI	TGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
1mFK_VII	GCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGC
1mFK_VIII	TGGGTGCTGCTGCTCTGGGT
1mFK_IX	CAGTTCCTGTTTCTGTTARTGCTCTGG
1mFK_X	TGCTCTGGTTATATGGTGTGATGGG
1mFK_XI	GCTGTTTTGTATACCTGGG
1mFK_XII	CTCAGCTCCTGTTGCTGTGGC
1mFK_XIII	CCTCATATTTTGTGCTGCTATGGG
1mFK_XIV	TGCTTTTCTGGATTTCAGCCTCCAG
1mFK_XV	TCAACTTCTGCTCTTCCTGCTGTTT
1mFK_XVI	CTAGCTCYTCTCCTCAGYCTTCTTCTCCTC
1mFK_XVII	GTGTMGGTGCTBRTGGG
1mFK_XVIII	STGYTGHTGYTCTGG
1mFK_XIX	GGGTATCTGGTACCTGTGG
1mRK	ACTGAGGCACCTCCAGATGTT
1mFL_I	ACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTC
1mFL_II	CTCTTCTTCTTCTTTGTTCTTCATTGCT
1mRL	GTACCATYTGCTTCCAGKCCACT

表 2 鼠源抗体轻链基因文库构建的第二轮巢式 PCR 的引物序列

Tab 2 Primer sequences of the second-round nested PCR for constructing mouse-origin antibody light chain gene library

Primer	Sequence (5'→3')
2mFK_I	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGAAAWTGTGCTCACCCAGTC
2mFK_II	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCCAAATTGTTCTCACCCAGTC
2mFK_III	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCRACATTGTGCTGACCCAATC
2mFK_IV	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGAAACAAGTGTGACCCAGTC
2mFK_V	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGATATTGTGATGACSCAGGC
2mFK_VI	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCRRTTGTGATGACCCARAC
2mFK_VII	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGATATCCAGATGACACAGAC
2mFK_VIII	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGACATTGTGATGACMCAGTC
2mFK_IX	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACHCAGTC
2mFK_X	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGACATCTTGCTGACTCAGTC
2mFK_XI	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCACACAGGCTGCACTCTCCAA
2mFK_XII	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCACTGGAGAAACAACACAGGC
2mFK_XIII	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGATGTCCAGATAACCCAG
2mFK_XIV	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGACATCTGTGATGACCCAATC
2mFK_XV	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCGATGTTGTGGTGACTCAAAC
2mFK_XVI	CTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCAGATGCAATATCCAGGTGATCCAG
2mRK_I	GATGAAGACAGATGGCGCCGCCACAGTTCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC



Continued Tab

Primer	Sequence (5'→3')
2mRK_II	GATGAAGACAGATGGCGCCGCCACAGTTCGTTTATTTCAGTCTGGTCCC
2mRK_III	GATGAAGACAGATGGCGCCGCCACAGTTCGTTTATTTCARCTTKGTSCC
2mFL_I	CTGCTGCTCTGGTTCACAGGTTCCAGATGCTTACTCAGCCAAGCTCT
2mFL_II	CTGCTGCTCTGGTTCACAGGTTCCAGATGCCAGGCTGTTGTGACTCAG
2mFL_III	CTGCTGCTCTGGTTCACAGGTTCCAGATGCCAACYTGTGCTCACTCAG
2mRL_I	AGTGACCGTGGGGTTGGCCTTGGGCTGACCTAGGACAGTCAGTTTGGTTCC
2mRL_II	AGTGACCGTGGGGTTGGCCTTGGGCTGACCTAGGACAGTGACCTTGGTTCC

1.2.4 嵌合抗体轻链表达质粒的构建及高亲和力人鼠嵌合抗体的筛选 通过同源重组分别将4个鼠源抗体轻链基因文库与人源轻链表达载体相连接, 构成完整的嵌合抗体轻链表达质粒, 经DH5 α 细菌转化、单克隆挑选后纯化该质粒。分别将上述4个嵌合抗体轻链表达质粒与固定的人源抗体重链表达质粒共同转染至293T细胞, 培养2~3 d后吸取细胞上清液作为嵌合抗体筛选样本。随后, 以SARS-CoV-2 S-trimer蛋白为抗

原, 采用ELISA对人鼠嵌合抗体行初轮筛选, 筛选条件为 $D(450\text{ nm}) > 0.2$ 。将此轮筛选得到的嵌合抗体依次以数字命名并进行纯化, 采用ELISA行第2轮筛选。其中, 以已发表的SARS-CoV-2的高亲和力抗体CR3022^[8]作为阳性对照, 以HIV的抗体VRC01^[5]作为阴性对照, 筛选出亲和力最高的人鼠嵌合抗体用于后续研究。上述构建及筛选流程如图2所示。

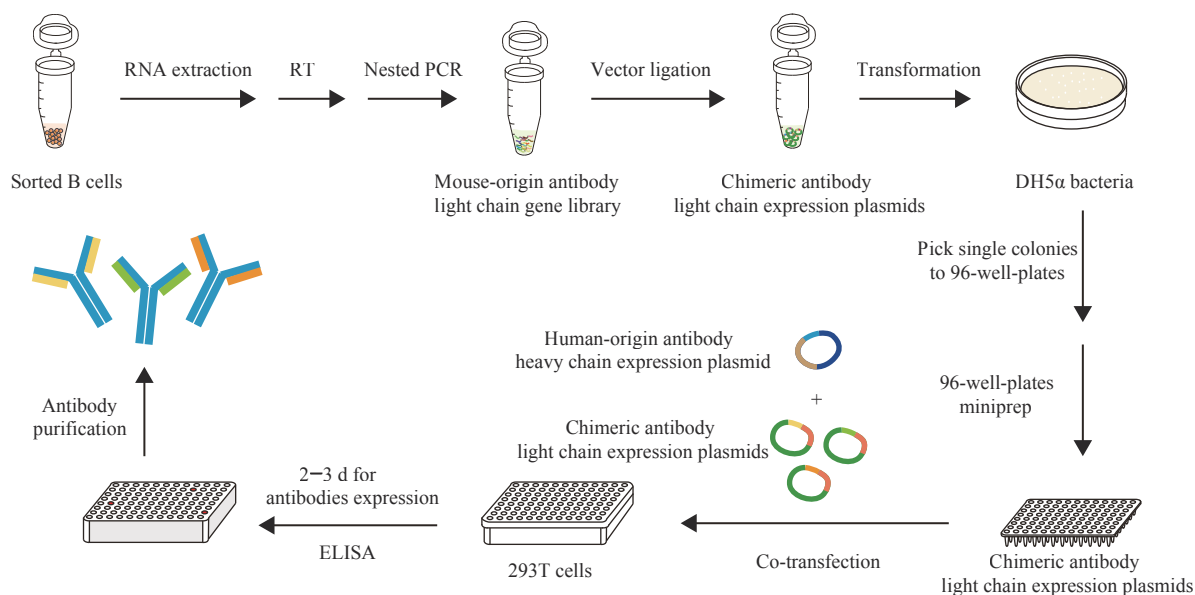


图2 鼠源抗体轻链基因文库构建及高亲和力人鼠嵌合抗体筛选流程

Fig 2 Construction of mouse-origin antibody light chain gene library and screening workflow of high-affinity human-mouse chimeric antibody

1.2.5 轻链氨基酸变化位点分析 对筛选到的高亲和力人鼠嵌合抗体的表达质粒进行Sanger测序, 获取轻链V、J基因序列信息。根据Igblast网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), 将其与鼠源胚系抗体轻链V、J基因序列信息进行比对, 分析高亲和力人鼠嵌合抗体轻链中V、J基因的突变情况, 并根据密码子表推测抗体轻链氨基酸的序列变化。

1.2.6 鼠源抗体轻链单个氨基酸位点改变抗体的构建及纯化 以“1.2.4”部分获得的具有最高亲和力的

人鼠嵌合抗体为对象, 仅保留其中1个氨基酸的变化, 以构建鼠源抗体轻链单个氨基酸位点改变的抗体, 经纯化后对该系列抗体开展关键位点的研究, 具体步骤如下: ①根据序列比对结果和鼠源胚系抗体基因序列, 分别设计引物行PCR扩增(引物序列见表3), 模板为筛选到的41号、40号抗体的轻链基因序列(其中40号抗体基因序列与鼠源胚系抗体基因序列相同), 以得到拟构建的抗体轻链基因片段。②将基因片段连接到轻链表达载体上, 构成完整的仅

含1个氨基酸变化的抗体轻链表达质粒(图3)。③分别将上述一系列抗体轻链表达质粒与固定的人源抗体

重链表达质粒共同转染至293S细胞进行抗体表达,并使用G蛋白亲和层析对其进行纯化。

表3 鼠源抗体轻链单个氨基酸改变的质粒构建的引物序列

Tab 3 Primer sequences for plasmid construction with single amino acid mutation in mouse-origin antibody light chain

Primer	Sequence (5'→3')
Adapter forward primer	TTCCCAGGTTCCAGATGCCAGGCTGTTGTGACTCAG
F98-deletion reverse primer	TGACCTTGGTTCCTCCACCGAACACCCAATGGTTGCTGTA
T76-mutation reverse primer	CCTTGTTTCCTCCACCGAACACCCAGAAATGGTTGCTGTACCATAG
Adapter reverse primer	GGTTGGCCTTGGGCTGACCTAGGACAGTGACCTTGG

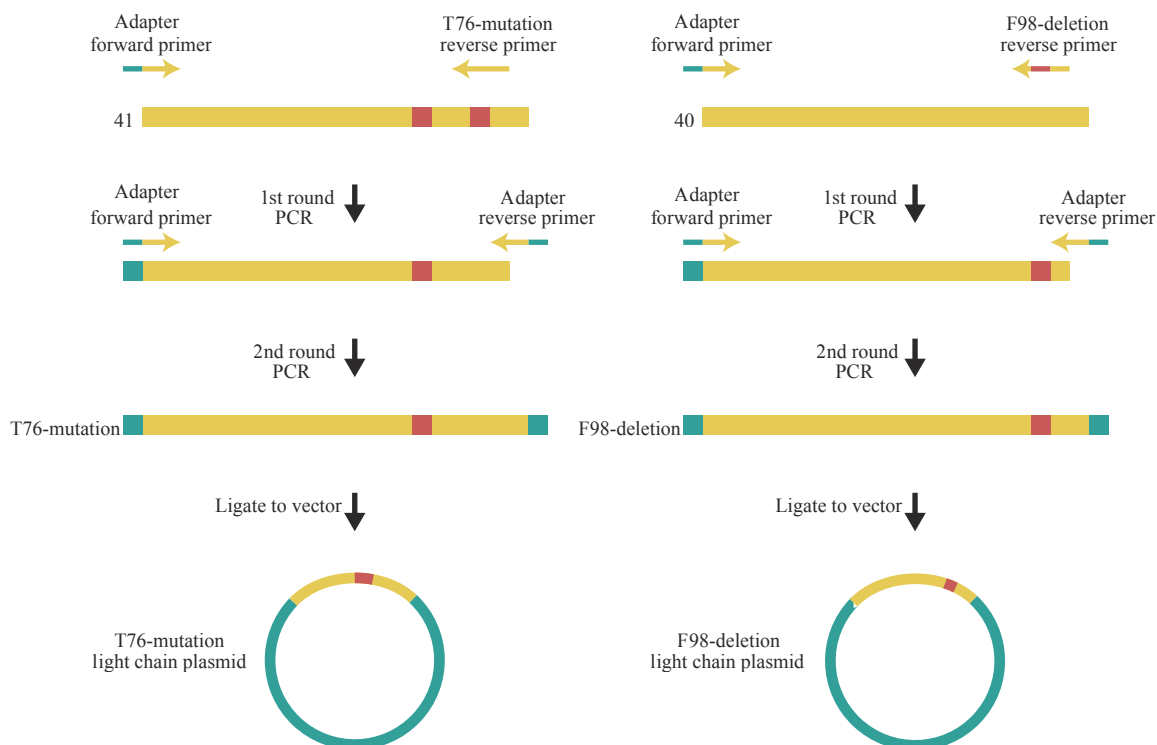


图3 鼠源抗体轻链单个氨基酸改变的质粒的构建

Fig 3 Construction of plasmids for mouse-origin antibody light chain with single amino acid change

1.2.7 不同抗体的亲和力以及中和能力检测 以前述步骤筛选到的具有最高亲和力的人鼠嵌合抗体(41号抗体)、轻链V区为鼠源胚系抗体基因编码的人鼠嵌合抗体(40号抗体)及构建的一系列轻链仅保留1个氨基酸变化的抗体为对象,分别采用ELISA(以SARS-CoV-2 S-trimer蛋白作为抗原)、假病毒中和实验对抗体与抗原的结合能力、各抗体的中和能力进行检测,其中以HIV的抗体VRC01^[5]作为阴性对照。计算每种抗体的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}), IC_{50} 越小表示其中和能力越强;当 $IC_{50}<1\text{ ng}/\mu\text{L}$

为很强, $1\text{ ng}/\mu\text{L}\leq IC_{50}<10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 为较强, $10\text{ ng}/\mu\text{L}\leq IC_{50}<100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 为较弱, $IC_{50}>100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 为无中和能力。

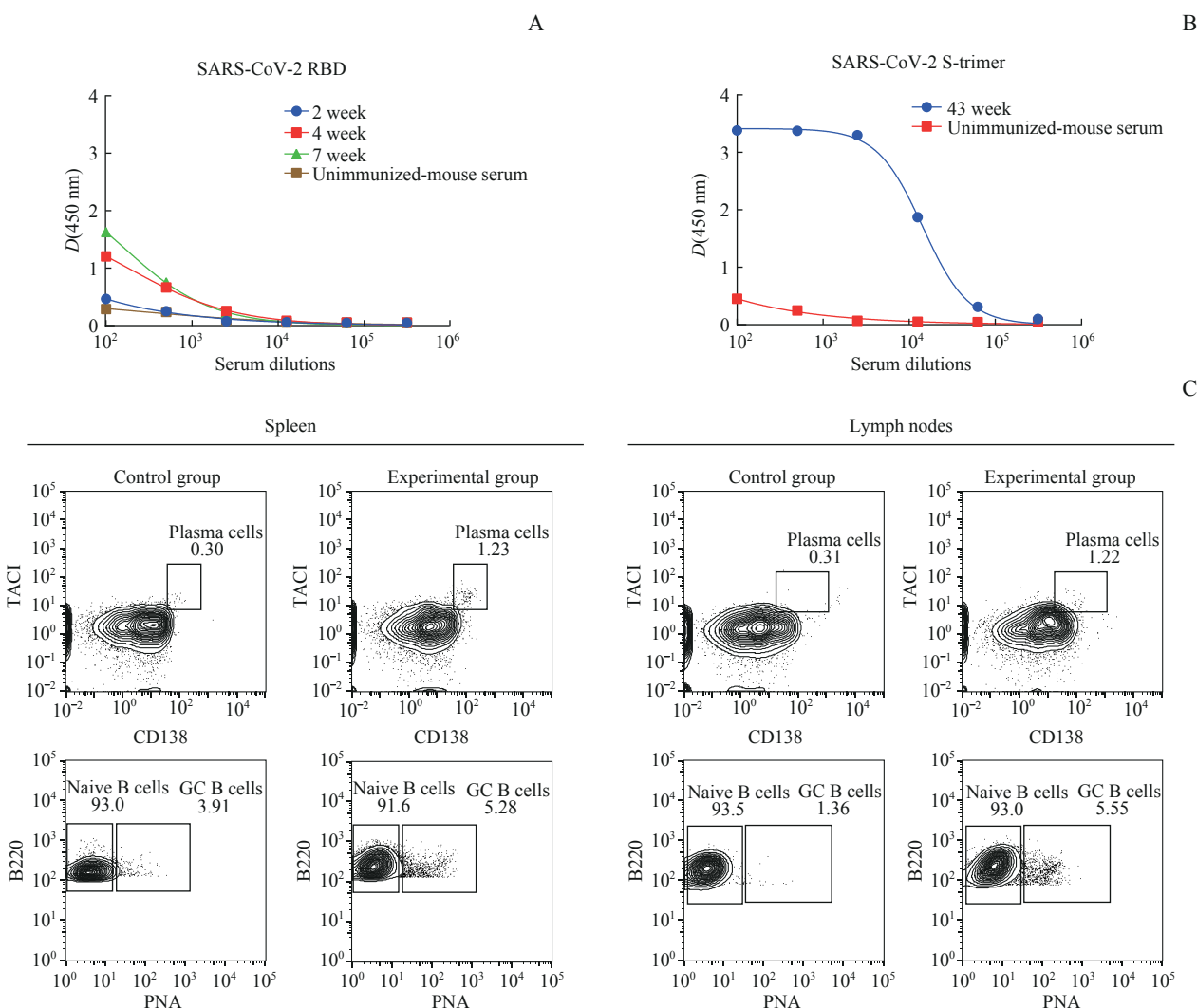
2 结果

2.1 小鼠血清中抗体滴度以及各类B细胞比例变化

通过ELISA或假病毒中和实验分析并比较各个时间点下2组小鼠血清中的抗体滴度,结果显示第2、4、7周时(即第1、2、3次免疫后)小鼠血清中与SARS-CoV-2 RBD结合的抗体滴度较低,与对照组间

无明显差别 (图4A), 第19、21周时 (即第5、6次免疫后) 血清中nAbs水平有所上升, 达到半最大效应的血清稀释倍数 (分别为94.6和172.5), 第43周时 (即第7次免疫后) 血清中与SARS-CoV-2 S-trimer结合的抗体滴度较高 (图4B); 继而提示, 在第7次免疫后小鼠体内产生了针对SARS-CoV-2的高亲和力抗体。

对第7次免疫1周后的小鼠的各B细胞群进行分析, 结果 (图4C) 显示: 与对照组相比, 实验组小鼠的幼稚B细胞群的比例无变化, 但浆细胞、GC B细胞的比例均有所增加; 在脾脏和淋巴结中, 实验组小鼠的浆细胞比例约是对照组的4倍, GC B细胞比例则分别是对照组的1.4倍和4.1倍。



Note: A. Detection of serum antibody titer using ELISA with SARS-CoV-2 RBD antigen. B. Detection of serum antibody titer using ELISA with SARS-CoV-2 S-trimer antigen. C. Detection of the proportions of different types of B cells in the spleen and lymph nodes of the two groups by flow cytometry.

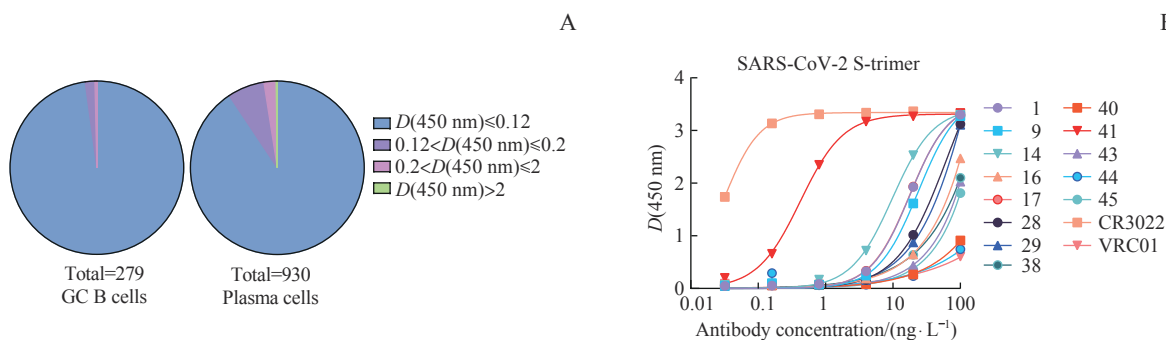
图4 2组小鼠的血清抗体水平及各类B细胞水平分析

Fig 4 Analysis of serum antibody levels and different types of B cell levels in the two groups of mice

2.2 高亲和力的人鼠嵌合抗体的筛选分析

采用ELISA对构建的鼠源抗体轻链基因文库表达的嵌合抗体进行初轮筛选, 结果 (图5A) 显示在由裂解自淋巴结的浆细胞、GC B细胞构建的抗体轻链基因文库表达组成的嵌合抗体中, 所有抗体的 $D(450\text{ nm})$ 均小于0.12; 而由裂解自脾脏的浆细胞、GC B细胞构建的抗体轻链基因文库表达组成的嵌合抗体中, 仅少数抗体的 $D(450\text{ nm}) > 0.2$, 其中1个

来自GC B细胞、2个来自浆细胞的抗体轻链组成的嵌合抗体的 $D(450\text{ nm}) > 2$ 。随后, 对所有 $D(450\text{ nm}) > 0.2$ 的嵌合抗体 (部分抗体未成功纯化) 行第2轮筛选, 结果 (图5B) 显示大多数嵌合抗体的亲和力较低, 其中来自脾脏GC B细胞文库的41号嵌合抗体具有最高的亲和力, 同样来自该文库的40号嵌合抗体的亲和力较低, 与阴性对照相近。



Note: A. First-round screening of human-mouse chimeric antibodies. B. Second-round screening of human-mouse chimeric antibodies.

图5 ELISA筛选人鼠嵌合抗体的亲和力

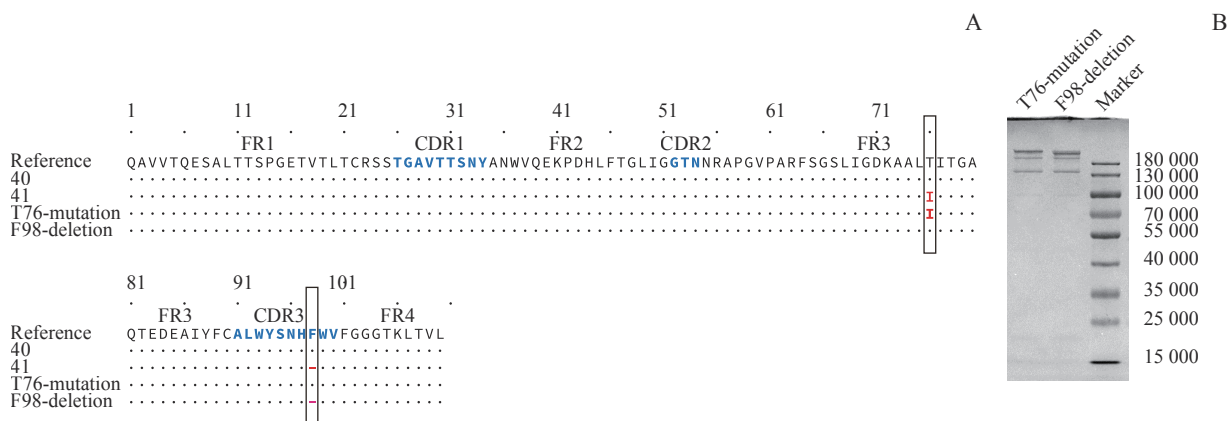
Fig 5 Screening for affinity of human-mouse chimeric antibodies by ELISA

2.3 高亲和力人鼠嵌合抗体轻链的氨基酸位点改变分析及T76-mutation、F98-deletion嵌合抗体的纯化

对上述两轮筛选得到的抗体的轻链表达质粒进行Sanger测序并结合密码子表进行分析,结果(图6A)显示41号抗体、40号抗体的轻链均由鼠源V基因(*IGLV1*01*)和J基因(*IGLJ1*01*)编码;其中,40号抗体轻链的基因序列上不具有任何突变,而41号抗体轻链的基因序列上有1处突变和1处缺失,其氨基酸序列表现为FR3处第76位苏氨酸被异亮氨酸

替换、CDR3处第98位苯丙氨酸发生缺失。通过比较40号抗体和41号抗体的轻链氨基酸序列并结合两轮筛选结果,我们发现鼠源轻链同时具有上述2个氨基酸改变或可使嵌合抗体亲和力升高。

通过上述分析,我们分别构建了轻链单个氨基酸改变的质粒,并纯化了由该质粒表达的抗体;其中,将轻链上第76位苏氨酸被异亮氨酸替换的嵌合抗体命名为T76-mutation,将轻链上第98位苯丙氨酸缺失的嵌合抗体命名为F98-deletion。结果(图6B)显示该2个抗体均得以成功纯化。



Note: A. Display of amino acid sequences of the screened chimeric antibodies and antibodies with single amino acid changes in light chains. B. SDS-PAGE results for chimeric antibodies purification.

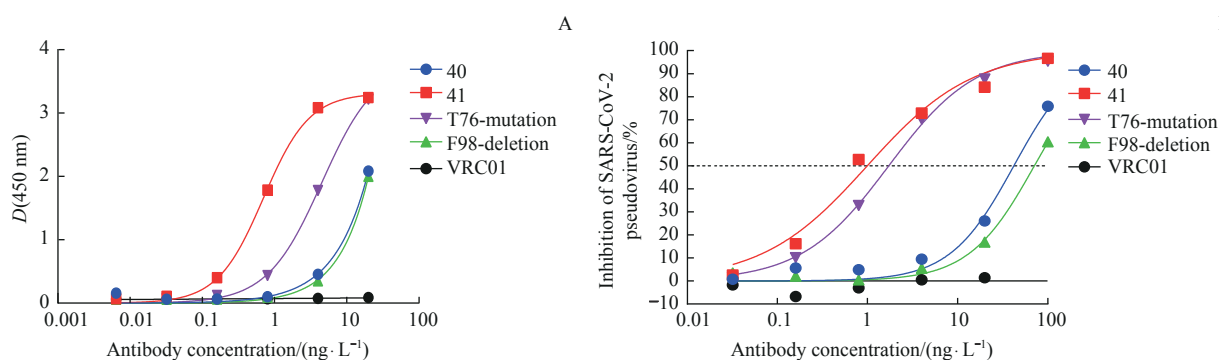
图6 高亲和力人鼠嵌合轻链上单个氨基酸位点的改变分析以及单个氨基酸改变的抗体的纯化

Fig 6 Analysis of single amino acid site changes in the light chain of high-affinity human-mouse chimeric antibody and purification of antibodies with single amino acid changes

2.4 单个氨基酸改变对高亲和力人鼠嵌合抗体的亲和力及中和能力的影响

分别采用ELISA、假病毒中和实验对40号抗体、41号抗体、T76-mutation和F98-deletion的亲和力、中和能力进行分析。ELISA结果(图7A)显示,41号抗体具有较强的结合能力,40号抗体、F98-deletion结合能力较弱,而T76-mutation的结合能力

介于40号抗体和41号抗体之间。假病毒中和实验的结果(图7B)显示,在这4个抗体中,41号抗体具有很强的中和能力,IC₅₀为0.995 ng/μL;T76-mutation的中和能力较强,IC₅₀为1.724 ng/μL;40号抗体、F98-deletion的中和能力较弱,IC₅₀分别为42.06 ng/μL和71.05 ng/μL。



Note: A. Analysis of antibody binding affinity by ELISA. B. Analysis of antibody neutralizing ability by pseudovirus neutralization assay.

图7 单个氨基酸改变对高亲和力的人鼠嵌合抗体的亲和力及中和能力的影响

Fig 7 Effect of single amino acid changes on the affinity and neutralization ability of high-affinity human-mouse chimeric antibodies

结合上述2个实验的结果我们发现,在41号抗体轻链的2个氨基酸改变中,第76位苏氨酸替换为异亮氨酸这单个氨基酸变化可提高嵌合抗体的亲和力及中和能力,第98位苯丙氨酸缺失的单个氨基酸变化对提高嵌合抗体的亲和力及中和能力的作用较小。

3 讨论

在对抗具有多种突变株的致病性病毒(如HIV、流感病毒等)及新的广泛传播病原体(如SARS-CoV-2)时,nAbs和bnAbs药物通常是最重要的治疗手段之一^[14-16]。有研究发现,在人体内筛选到的针对SARS-CoV-2的nAbs通常仅携带很少的SHM^[8,17],而通过积累SHM突变可进一步增强抗体的中和能力^[10,16]。同时,有研究将人抗体基因敲入或整合到小鼠染色体上,证实可通过多次免疫的方式在小鼠体内筛选到有功能的嵌合抗体^[18-19]。基于此,本研究通过使用SARS-CoV-2相关抗原多次免疫抗体重链基因人源化小鼠,在小鼠体内B细胞中积累SHM,以产生具有中和能力的嵌合抗体。

有研究提出抗体重链对于抗体轻链具有选择性,是决定B细胞克隆选择的关键^[20-21],而有研究则提出某抗体的轻链是阻止疟原虫入侵的关键^[22]。在针对SARS-CoV-2的抗体中,已有研究发现某些抗体重链上的突变具有关键作用^[10-12],但抗体轻链对其中和能力有何影响,是否存在影响中和能力的关键突变,是值得探讨的问题。本研究筛选获得了一个针对SARS-CoV-2具有中和能力的人鼠嵌合抗体,发现仅需要抗体轻链FR3处的一个关键改变就可以使中和能力弱的抗体变成中和能力很强的抗体。既往研究认为,

CDR的改变会直接影响抗体与抗原分子间的接触,从而决定抗体的亲和力和中和能力^[23]。然而CDR的改变也可能增加抗体分子的热不稳定性,因此需要FR的相应改变以保持抗体分子的稳定性,使抗体具有更强的中和能力^[24]。此外,抗体重链FR的改变可能通过依赖FR之间的同型相互作用的别构抑制等机制来增加抗体的亲和活性^[9,25]。综合上述研究我们推测,本研究发现的位于抗体轻链FR3的关键氨基酸改变可能通过类似的机制,使完整的嵌合抗体分子更加稳定,从而增强了该嵌合抗体的亲和力和中和能力。

考虑到小鼠体内同时拥有重链和轻链突变的抗体可能具有更强的亲和力,本研究仅使用固定未突变的人源抗体重链基因与在体内积累SHM的鼠源轻链配对进行嵌合抗体筛选,而并未筛选在体内积累SHM的重链基因,但这可能导致筛选到的抗体并非小鼠体内具有最强中和能力的抗体。因此,若要筛选同时具有重链和轻链SHM的抗体,应使用如单细胞BCR测序、单个B细胞RT-PCR等技术,以获得来自同一个B细胞的具有SHM的抗体重链和轻链,从而达到筛选中和能力最强的嵌合抗体的目的。

综上,本研究筛选到了针对SARS-CoV-2具有中和能力的人鼠嵌合抗体,并发现了其轻链上存在1处对于该抗体中和能力具有决定作用的氨基酸位点改变,从而揭示了抗体轻链单个位点氨基酸改变对抗体中和能力同样具有关键作用。本研究的结果或将为抗体的优化提供一种新思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院动物福利和使用机构委员会审核批准(审批号:A2019-042)。所有实验过程均遵照上海交通大学医学院实验动物福利相关要求和操作规范进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. A2019-042). All experimental animal protocols were carried out by following the guidelines for the care and use of laboratory animals of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

作者贡献/Authors' Contributions

叶菱秀设计了本研究,殷姿、廉朝阳、高波、田莹参与了实验操作和数据整理,殷姿、廉朝阳、郝茜、叶菱秀参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by YEAP Lingsiew. The experiments operation and data analysis were done by YIN Zi, LIAN Chaoyang, GAO Bo and TIAN Ying. The manuscript was drafted and revised by YIN Zi, LIAN Chaoyang, HAO Qian and YEAP Lingsiew. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-01-13
- Accepted: 2023-06-05
- Published online: 2023-06-28

致谢 感谢北京大学生命科学学院蒋争凡课题组、上海交通大学医学院徐颖洁课题组提供试剂支持;感谢复旦大学上海医学院基础医学院黄竞荷课题组提供小鼠血清中和实验技术支持。

参·考·文·献

- [1] OOSTINDIE S C, LAZAR G A, SCHUURMAN J, et al. Avidity in antibody effector functions and biotherapeutic drug design[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(10): 715-735.
- [2] ROBINSON W H. Sequencing the functional antibody repertoire: diagnostic and therapeutic discovery[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(3): 171-182.
- [3] YU X C, TSIBANE T, MCGRAW P A, et al. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors[J]. *Nature*, 2008, 455(7212): 532-536.
- [4] LI T T, CHEN J Y, ZHENG Q B, et al. Identification of a cross-neutralizing antibody that targets the receptor binding site of H1N1 and H5N1 influenza viruses[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5182.
- [5] DUFLOO J, PLANCHAIS C, FRÉMONT S, et al. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies tether viral particles at the surface of infected cells[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 630.
- [6] WALKER L M, HUBER M, DOORES K J, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 466-470.
- [7] WU Y C, KIPLING D, LEONG H S, et al. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations[J]. *Blood*, 2010, 116(7): 1070-1078.
- [8] ROGERS T F, ZHAO F Z, HUANG D L, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model[J]. *Science*, 2020, 369(6506): 956-963.
- [9] LIANG W C, YIN J P, LUPARDUS P, et al. Dramatic activation of an antibody by a single amino acid change in framework[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 22365.
- [10] RAPP M, GUO Y C, REDDEM E R, et al. Modular basis for potent SARS-CoV-2 neutralization by a prevalent VH1-2-derived antibody class[J]. *Cell Rep*, 2021, 35(1): 108950.
- [11] TORTORICI M A, BELTRAMELLO M, LEMPP F A, et al. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms[J]. *Science*, 2020, 370(6519): 950-957.
- [12] LIU L H, WANG P F, NAIR M S, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike[J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 450-456.
- [13] VON BOEHMER L, LIU C, ACKERMAN S, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(10): 1908-1923.
- [14] MASCOLA J R, HAYNES B F. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways[J]. *Immunol Rev*, 2013, 254(1): 225-244.
- [15] CORTI D, LANZAVECCHIA A. Broadly neutralizing antiviral antibodies[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 705-742.
- [16] MUECKSCH F, WEISBLUM Y, BARNES C O, et al. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations[J]. *Immunity*, 2021, 54(8): 1853-1868. e7.
- [17] KREER C, ZEHNER M, WEBER T, et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 843-854. e12.
- [18] CHEN X J, ZHOU T Q, SCHMIDT S D, et al. Vaccination induces maturation in a mouse model of diverse unmutated VRC01-class precursors to HIV-neutralizing antibodies with >50% breadth[J]. *Immunity*, 2021, 54(2): 324-339. e8.
- [19] TIAN M, MCGOVERN K, CHENG H L, et al. Conditional antibody expression to avoid central B cell deletion in humanized HIV-1 vaccine mouse models[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(14): 7929-7940.
- [20] ZHOU J Q, KLEINSTEIN S H. Cutting edge: Ig H chains are sufficient to determine most B cell clonal relationships[J]. *J Immunol*, 2019, 203(7): 1687-1692.
- [21] JAFFE D B, SHAHI P, ADAMS B A, et al. Functional antibodies exhibit light chain coherence[J]. *Nature*, 2022, 611(7935): 352-357.
- [22] WANG L T, HURLBURT N K, SCHÖN A, et al. The light chain of the L9 antibody is critical for binding circumsporozoite protein minor repeats and preventing malaria[J]. *Cell Rep*, 2022, 38(7): 110367.
- [23] BARNES C O, WEST A P Jr, HUEY-TUBMAN K E, et al. Structures of human antibodies bound to SARS-CoV-2 spike reveal common epitopes and recurrent features of antibodies[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 828-842. e16.
- [24] LOMBANA T N, DILLON M, BEVERS J 3rd, et al. Optimizing antibody expression by using the naturally occurring framework diversity in a live bacterial antibody display system[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17488.
- [25] KLEIN F, DISKIN R, SCHEID J F, et al. Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization[J]. *Cell*, 2013, 153(1): 126-138.

[本文编辑] 邢宇洋

